综述

Kisspeptins对下丘脑-垂体-性腺轴作用机制新进展

石明晴[1],周惠芳[2]
[1]丽水市中医院,浙江 丽水 3230002;[2]南京中医药大学第一临床医学院,江苏 南京 210029

摘要:近年来,Kisspeptins的发现使人们对调控青春期和生殖的神经内分泌轴有了新的认识。Kisspeptins不仅是促进GnRH分泌的上游因子,而且调控下丘脑-垂体-卵巢轴,主要表现在促性腺激素分泌的调节、青春期的启动以及生殖功能的调控等方面。通过对健康人群及生殖内分泌紊乱患者的观察,发现Kisspeptins可以刺激GnRH分泌,后者诱导LH分泌,而且增强LH的脉冲频率。这些研究表明Kisspeptins将成为生殖内分泌研究的热点,并为生殖内分泌疾病提供新的治疗策略。目前许多动物试验研究证明Kisspeptins在以下几个方面也存在潜在的作用,如卵巢的功能的调节、胚胎植入及胎盘的形成。本文将集中收集关于Kisspeptins调控GnRH的脉冲式分泌的现有的依据,特别是青春期启动及生殖内分泌方面。
关键词: Kisspeptins;下丘脑-垂体-性腺轴;GnRH分泌;青春期启动;生殖内分泌功能

New progress in the mechanism of Kisspeptins on hypothalamic pituitary gonadal axis

SHI Mingqing[1], ZHOU Huifag[2]
[1]Lishui Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Province, Lishui 323000, China; [2]The first clinical medical college of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu province, Nangjing 210023, China

Abstract: In recent years, the discovery of Kisspeptins makes people have a new understanding of the neuroendocrine axis regulating puberty and reproduction. Kisspeptins is not only the upstream factor that promotes the secretion of GnRH, but also regulates the hypothalamic pituitary ovary axis, which is mainly manifested in the regulation of gonadotropin secretion, the initiation of puberty and the regulation of reproductive function. By observing the healthy population and reproductive endocrine disorders, we found that Kisspeptins can stimulate the secretion of GnRH, which induces LH secretion, and enhance the pulse frequency of LH. At present, many animal experiments have proved that Kisspeptins has the potential function in the following aspects, such as the function of ovary, embryo implantation and placenta formation. This article will focus on the existing basis for the Kisspeptins regulation of GnRH pulse type secretion, in particular, the initiation of puberty and reproductive endocrine aspects.
Keywords: kisspeptins; hypothalamic pituitary gonadal axis; GnRH secretion; puberty initiation; reproductive and endocrine function

如今普遍认为下丘脑分泌的促性腺激素释放激素(GnRH)是调控生殖功能的关键途径[1]。但是这一途径的局限性使得人们认为:是否存在中间通路控制下丘脑-垂体-性腺轴。通过对GnRH神经元中缺乏雌激素受体(ER-α)的大鼠研究,发现了一些上游通路介导性腺反馈[2]。

近年来,由于Kisspeptins的发现刷新了人们对调控青春期启动及生殖的神经内分泌轴的认识[1]。Kisspeptins通过调节GnRH的分泌而对丘脑-垂体-性腺轴的调控,为阐明生殖中枢性和外周性调节机制复杂性提供理论依据[3]。Kisspeptin是一种多肽,由kiss-1基因编码,存在于下丘脑中[4]。Kisspeptins作为促进GnRH分泌的上游因子,在促进促性腺激素分泌、青春期的启动及生殖内分泌方面起关键性作用[5]。近来研究发现,除了Kisspeptin,还有以下神经肽介入生殖内分泌的调控,如:神经激肽-Y(NPY)、nesfain-1[6-7]及神经激肽-B[8]。分泌Kisspeptin和NPY的神经元,也分泌强啡肽,共同构成Kisspeptin-神经激肽B-强啡肽(KNDy)神经网络[8]。本文重点关注有关Kisspeptin调控GnRH脉冲频率的理论依据,但也不忽略调控KISS-1/kisspeptin/GPR54系统的其他因素。

收稿日期:2016-07-14
作者简介:石明晴,硕士,主治医师,E-mail: 936391460@qq.com
通信作者:周惠芳,主任医师,教授,博士研究生导师,E-mail: zhouhuifang2011301@163.com

1 KISS-1/kisspeptin/GPR54系统的发现

Lee等[4]在研究人黑瘤素细胞不同转移能力时,发现KISS-1基因。2001年,人们通过研究发现了KISS-1基因的产物肽-Kisspeptin,它们属于同一蛋白质前体不同水解过程的产物。Kisspeptin能裂解成Kisspeptin-14、-13、-10等,它们因为具有相似的生物特性

和功能，而被统称为Kisspeptins。主要的Kisspeptin肽是一个54个氨基酸的肽，被称为metastin或Kisspeptin-54[9]。研究表明，Kisspeptin是GPR54的配体，Kisspeptins的C末端一般都有-Arg-Phe-NH2(-Rfamide)(精氨酸-苯丙氨酸酰胺基)序列，这对维持其生物活性具有重要意义[3]。GPR54是KISS-1蛋白的受体，属G蛋白偶联受体视紫红质家族成员，直到发现它与Kisspeptin具有非常高的亲和力时，人们才开始才重视和研究它[10]。

2 Kisspeptins的生殖内分泌功能

2003年，当人们利用GPR54基因敲除小鼠和人类特发性促性腺激素分泌不足性腺机能减退症(IHH)个体作为研究研究对象，研究KISS-1/GPR54系统对青春期的作用时，发现了Kisspeptins的生殖内分泌功能，GPR54突变小鼠的表型与性腺类固醇激素分泌缺乏时一致，即突变的雌性小鼠没有经历性成熟，当与成熟雄性交配时，它们表现出阴道开张失败，不能受孕；雄性突变个体表现为睾丸和阴茎很小，并且不能产生精子[11]。GPR54突变或受体缺失能造成人或小鼠的IHH疾病，因此可以表明GPR54发出的信号是性成熟的先决条件[12]。这些发现证实了Kisspeptin和GPR54是青春期启动和生殖内分泌功能的关键环节，而且为揭开Kisspeptin与生殖功能之间的神秘关系的进一步探索铺平了道路。

3 Kisspeptin系统的功能性神经解剖

通过对人类及其他各种物种的研究发现，Kisspeptin主要存在于下丘脑的漏斗/弓状核。人体标本的研究证实，人类的Kisspeptin神经元主要位于漏斗区(其他物种位于弓状核)和延髓视前区(POA)[13]。通过GnRH神经元对KisspeptinRmRNA的表达[14]，发现Kisspeptin直接参与GnRH的分泌。后来亦有研究发现，位于人类漏斗区/啮齿类动物弓状核的Kisspeptin神经元也表达其他的神经肽，命名为神经激肽-B和强啡肽，被统称为KNDy神经元[13, 15]，而位于POA的神经元并未参与表达[1]。通过KNDy神经元对强啡肽受体(k-阿片肽受体)和神经激肽-B受体的表达证明，KNDy神经元调节Kisspeptin和GnRH的脉冲式分泌[16-17]；(2)这就意味，通过强啡肽和神经激肽-B的抑制和刺激作用，KNDy神经元调节Kisspeptin的分泌，进而调节GnRH和LH脉冲释放[16]。也有研究认为，KNDy神经元调节Kisspeptin的分泌，主要是依赖于类固醇激素的正负反馈调节[18]。

4 Kisspeptins调控GnRH分泌的生理功能

研究表明，Kisspeptin通过与GnRH受体的相互作用，直接作用于GnRH神经元，并促进GnRH释放。而GnRH又刺激垂体分泌促卵泡雌激素(FSH)和LH的分泌[1]。Oakley等[18-19]已经证实Kisspeptin可使GnRH神经元对GnRH的表达增强。

5 Kisspeptin对GnRH脉冲产生的作用

Kisspeptin对GnRH脉冲式分泌的控制，对于将来有关生殖的药物治疗，具有巨大的潜力[20]。Kisspeptin神经元作为一种GnRH脉冲发生器，可能在两性生殖功能方面起作用，如卵泡的发育、性激素的分泌和精子的产生[20]。有证据表明，Kisspeptin神经元大量存在于弓状核(ARC)被认为是GnRH脉冲产生的中心，因为把Kisspeptin拮抗剂注入ARC能消除GnRH脉分泌，而把Kisspeptin拮抗剂注入POA，则不能出现上述情况[21-22]。亦有药理研究提示，人体注射Kisspeptin-10和Kisspeptin-54，能增加促性腺激素的分泌，尤其是LH[23-24]。

6 Kisspeptin神经元作为性激素的负反馈通路

有假说提出，可能有一些神经元作为中间桥梁，介导类固醇激素的反馈信号与不能表达雌激素类受体的GnRH神经元之间的传递。近来研究表明，KNDy神经元能介导类固醇激反馈调节GnRH神经元[5]。Kisspeptin神经元的显著特征是，几乎全部都表达ER-α，部分表达雌激素受体-β[25]。Kisspeptin神经元调节性激素的负反馈的证据来源于对雄性和去势雌性大鼠的研究，该研究揭示了下丘脑中Kiss-1mRNA的高表达，并且与循环中性激素水平的增加呈平行水平。亦有研究表明，雌激素的负反馈主要是通过Kisspeptin神经元介导的ER-α[25]，而不是GnRH神经元。这一说法在以下研究中也得到了证实，在选择性去除雌激素受体的小鼠模型中，发现KISS-1mRNA表达增多与LH水平明显增加呈相关性[26]。并有证据表明，神经激肽-BK和kisspeptin对雌激素的负反馈有协同作用[18]。也有研究表明强啡肽介导性激素的负反馈，主要是通过绝经后妇女漏斗核[27]及去势动物弓状核中强啡肽原mRNA的表达增强而发现[28]。以上研究均表明，类固醇激素负反馈调节GnRH神经元，主要是通过刺激强啡肽的分泌和抑制神经激肽-B及Kisspeptin神经元的分泌。

7 Kisspeptin神经元作为性激素的正反馈通路，以及在排卵前的作用

令人信服的啮齿类动物研究表明，雌激素刺激AVPV(腹侧脑室周围白质核)神经元，并与活性孕激素受体(PRs)协同作用，通过诱导排卵前LH峰体现正反馈作用[5]。去势后的雌性及雄性小鼠AVPV区的Kiss-1 mRNA的表达均下降，但是给予性激素替代治疗后，其表达均增加[25]。对大鼠的进一步研究表明，

AVPV区的Kisspeptin神经元的活性增加[29]早于雌激素诱导的LH排卵峰。最近在啮齿动物研究也表明,位于AVPV区的Kisspeptin神经元活性同步于雌激素依赖性昼夜节律[30-32]。研究表明,在卵泡发育晚期,雌激素能增加Kiss-1 mRNA在猪侧脑室旁核和羊POA/ARC区的表达,与体内的雌激素高峰对应,但早于GnRH激增[33-34]。

首个大鼠药理研究通过发现KP-10可以导致排卵期LH最大量分泌,证明了类固醇激素对Kisspeptin的反应[35]。最近动物药理研究表明,Kisspeptin可导致早期LH峰[36],但是Kisspeptin拮抗剂却减弱排卵期LH和FSH峰[37]。人类注射Kisspeptin-54产生LH峰,可使卵母细胞成熟[38]。另一项研究表明,Kisspeptin-54可产生LH峰,并缩短女性月经周期[39]。另外,给去势大鼠注射Kisspeptin-10,只有在雌孕激素替代治疗后,才能对促性腺激素起反应[35]。进一步的研究发现选择性阻断大鼠ER-α,明显抑制LH反应,外周注射KP-10后,并不能出现排卵前LH峰值[40-41]。这些研究还观察到,给去势大鼠补充孕激素及选择性雌激素受体-激动剂有利于他们的潜在诱导排卵期促性腺激素的激增[5]。

8 Kisspeptin与生殖内分泌疾病的关系

研究表明Kisspeptin与临床上许多引起不孕的疾病密切相关,如多囊卵巢综合症,多囊卵巢综合症是一种具有代谢异常及内分泌异常表现的疾病,而Kisspeptin与体内代谢状况与内分泌环境存在关联[42],因此与多囊卵巢综合症的发生发展密切相关,Jeon等[43]研究发现多囊卵巢综合症患者血清中Kisspeptin水平明显升高;再如影响排卵的高泌乳素血症,易导致月经失调和不孕,Charlotte[44]等利用小鼠作为模式动物,他们发现在小鼠中,高泌乳素血症不仅直接抑制kisspeptin分泌,而且通过阻止GnRH的分泌而有效地阻断卵巢周期性。此外,Kisseptin与其他生殖内分泌疾病也存在一定关联,如GPR-54基因敲除的小鼠表现出IHH等[45]。由此推Kisspeptin与卵巢功能存在潜在联系。此外Kisspeptin作为GnRH的上游调节因子,国外已有研究表明Kisspeptin可用于诱导排卵,并减少卵巢过度刺激综合症的发生[46-47]。

9 结论

目前已有充分证据支持kisspeptins作为GnGH脉冲分泌中央调制器,在控制青春期启动和在人类两性生殖中起着举足轻重的作用。也有明显的证据表明kisspeptins作为生殖和人体代谢之间的重要纽带,介导性激素的正、负反馈信号来调节GnRH神经元。

人类外周注射的kisspeptin,也被视为一个潜在的新的治疗方案,在促性腺激素脉冲分泌紊乱的疾病治疗方面,而且是目前研究的一个热点。目前相关领域已作了大量的工作,但仍需要制定一个合适的方案,使kisspeptin可以用于人类不孕不育和生殖障碍的治疗。Kisspeptin对外周生殖器官的作用,表明其在调节重要生理过程中的作用确定,包括卵巢功能、胚胎植入和胎盘形成。但是,对于这些研究结果与人类有相关性,还需要更有力的证据,因为目前的研究仅涉及动物模型。

参考文献:

[1] Skorupskaite K, George JT, Anderson RA. The kisspeptin-GnRH path-way in human reproductive health and disease[J]. Hum Reprod Update, 2014, 13(20): 485-500.
[2] Herbison AE, Theodosis DT. Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase,cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat[J]. Neuroscience, 1992, 13(50): 283-98.
[3] Roseweir AK, Millar RP. The role of kisspeptin in the control of gon-adotrophin secretion[J]. Hum Reprod Update, 2009, 9(15): 203-12.
[4] Lee JH, Miele M, Hicks DJ, et al. KiSS-1,a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene[J]. J Natl Cancer Inst, 1996, 10(88): 1731-7.
[5] Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, et al. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms[J]. Physiol Rev, 2012, 20(92): 1235-316.
[6] Garcia GD, Navarro VM, Roa J, et al. The anorexigenic neuropep-tide,nesfatin-1,is indispensable for normal puberty onset in the female rat[J]. J Neurosci, 2010, 12(30): 7783-92.
[7] Pralong FP. Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 12(324): 82-6.
[8] Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview:kisspeptin/neuro-kinin B/dynorphin(KNDy) cells of the arcuate nucleus:a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion[J]. Endocrinology, 2010, 31(151): 3479-89.
[9] Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor[J]. Nature, 2001, 33(411): 613-7.
[10] 甘晓红,洪华珠,肖君华. GPR54及其配体与青春期发育[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2006, 26(6): 424-6.
[11] Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system[J]. Biochem Biophys Res Com, 2003, 3(12): 1357-63.
[12] Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, et al. Kiss1-/-mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54-/-mice[J]. Endocrinol , 2007, 15 (148): 4927-36.
[13] Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, et al. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons[J]. Eur J Neur, 2010, 31(11): 1984-98.
[14] Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine Switch for the onset of puberty[J]. J Neurosci, 2005, 25(49): 11349-56.
[15] Cheng GL, Coolen LM, Padmanabhan VA, et al. The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate

nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep [J]. Endocrinology, 2010, 151(1): 301-11.

[16] Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, et al. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/ neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse [J]. J Neurosci, 2009,10(29): 11859-66.

[17] Herbison AE, de Tassigny X, Doran J,et al. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain, gonadotropin-releasing HN[J]. Endocrinol, 2010, 14(151): 312-21.

[18] Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain[J]. Endocr Rev, 2009, 30(6): 713-43.

[19] Novaira HJ, Ng Y, Wolfe A, et al. Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 311(1/2): 126-34.

[20] Okamura H, Tsukamura H, Ohkura S, et al. Kisspeptin and GnRH pulse Generation[J]. Ad Exper Med Biol , 2013, 42(784): 297-323.

[21] Clarkson J, de Tassigny XD, Colledge W, et al. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain [J]. J Neuroendocrinol, 2009, 21(8): 673-82.

[22] Ramaswamy S, Guerriero KA, Gibbs RB. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (Macaca mulatta) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy [J]. Endocrinology, 2008, 149(9): 4387-95.

[23] George JT, Veldhuis JD, Roseweir AK, et al. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men[J]. J Clin Endo Met, 2011(96): E1228-36.

[24] Jayasena CN, Comninos AN, Veldhuis JD, et al. A single injection of kisspeptin-54 temporarily increases luteinizing hormone pulsatility in healthy women[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2013, 79(4): 558-63.

[25] Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, et al. Regulation of kiss1 gene expression in the brain of the female mouse [J]. Endocrinol, 2005, 14(6): 3686-92.

[26] Mayer C, Acosta MM, Dubois SL, et al. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons[C]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010.

[27] Rometo AM, Rance NE. Changes in prodynorphin gene expression and neuronal morphology in the hypothalamus of postmenopausal women[J]. J Neuroendocrinol, 2008, 20(12): 1376-81.

[28] Foradori CD, Goodman RL, Adams VL, et al. Progesterone increases dynorphin a concentrations in cerebrospinal fluid and preprodynorphin messenger ribonucleic acid levels in a subset of dynorphin neurons in the sheep [J]. Endocrinology, 2005, 146(4): 1835-42.

[29] Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, et al. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feed-back action on luteinizing hormone release in female rats [J]. Journal Rep Dev, 2007, 11(53): 367-78.

[30] Williams WP, Jarjisian SG,Mikkelsen JD,et al. Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovula- tory luteinizing hormone surge[J]. Endocrinol, 2011, 19(152): 595-606.

[31] Xu Z, Kaga S, Tsubomizu J, et al. Circadian transcriptional factor DBP regulates expression of Kiss1 in the anteroventral periventricular nu-cleus [J]. Mol Cel Endocrinol, 2011, 12(339): 90-7.

[32] Robertson JL, Clifton DK, de Iglesia HO, et al. Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonado-tropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge[J]. Endocrinol, 2009, 11(150): 3664-71.

[33] Smith JT, Li Q, Pereira A, et al. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge[J]. Endocrinology, 2009, 150(12): 5530-8.

[34] Hoffman GE, Le WW, Franceschini IA, et al. Expression of Fos and *in vivo* median eminence release of LHRH identifies an active role for preoptic area kisspeptin neurons in synchronized surges of LH and LHRH in the ewe[J]. Endocrinology, 2011, 152(1): 214-22.

[35] Roa J, Vigo E, Castellano JM, et al. Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female rat [J]. Endocrinology, 2006, 147(6S): 2864-78.

[36] Caraty A, Smith JT, Lomet D, et al. Kisspeptin synchronizes Preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes[J]. Endocrinology, 2007, 148(11): 5258-67.

[37] Pineda R, Garcia GD, Roseweir A, et al. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist[J]. Endocrinology, 2010, 151(2): 722-30.

[38] Kim W, Jessen HM, Auger AP, et al. Postmenopausal increase in KiSS-1,GPR54, and luteinizing hormone releasing hormone (LHRH-1)mRNA in the basal hypothalamus of female rhesus mon-keys[J]. Peptides, 2009, 9(30): 103-10.

[39] Jayasena CN, Comninos AN, Nijher GM. Twice-dailysubcutaneous injection of kisspeptin-54 does not abolish menstrual cyclicity in healthy female volunteers [J]. J Clin Endo Met, 2013, 16(98): 4464-74.

[40] Roa J, Vigo E, Castellano JM, et al. Follicle-stimulating hormone re-sponses to kisspeptin in the female rat at the preovulatory period: modulation by estrogen and progesterone receptors[J]. Endocrinol, 2008, 14(9): 5783-90.

[41] Roa J, Vigo E, Castellano JM, et al. Opposite roles of estrogen receptor(ER)-alpha and ERbeta in the modulation of luteinizing hormone re-sponses to kisspeptin in the female rat:implications for the Generation of the preovulatory surge [J]. Endocrinol, 2008, 14 (9): 1627-37.

[42] 胡雅婷, 温俊平, 陈 刚. Kisspeptin/GPR54系统与能量代谢的关系[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2010, 30(2): 110-2.

[43] Jeon YE, Ke LE, Jung JA, et al. Kisspeptin,leptin,and retinol-bind-ing protein 4 in women with polycystic ovary syndrome[J]. Gynecol Obstet Invest, 2013, 75(9): 268-74.

[44] Sonigo C, Bouilly J, Carre N, et al. Hyperprolactinaemia-induced ovarian acyclicity is reversed by kisspeptin administration[J]. J Clin Invest, 2012, 122(10): 3791-5.

[45] Wahab F, Atika B, Shahab M. Kisspeptin as a Link between metabolism and reproduction: Evidences from rodent and Primate studies[J]. Metabolism, 2013, 62(7): 898-910.

[46] Abbara A, Jayasena CN, Christopoulos GA, et al. Efficacy of kisspeptin-54 to trigger oocyte maturation in women at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) during *in vitro* fertilization (IVF) therapy[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100 (9): 3322-31.

[47] Castillo JC, Humaidan P, Rafael B. Pharmaceutical options for triggering of final oocyte maturation in ART[J]. Biomed Res Intern, 2014, 4(8): 66-70.